

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Endofit sebagai Pupuk Hayati

Pupuk hayati atau *biofertilizer* didefinisikan sebagai produk yang mengandung mikroba hidup atau dorman dari kelompok bakteri, fungi, *actinomycetes* dan alga yang secara sendiri atau kombinasi mampu melakukan mekanisme seperti fiksasi N₂, solubilisasi fosfat atau sekresi senyawa tertentu yang memacu pertumbuhan tanaman sehingga meningkatkan hasil panen (Naveed, dkk, 2015).

Bakteri endofit merupakan bakteri yang mampu hidup di dalam jaringan tanaman. Simbiosis antara endofit dan inangnya dapat bersifat merugikan (sebagai patogen) maupun menguntungkan (Hallmann, 1997). Terdapat berbagai mekanisme endofit dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman diantaranya sebagai pemfiksasi N₂, penghasil hormon pertumbuhan (Susilo, 2015), pelarut fosfat (Young dkk, 2013) penghasil *siderophore* (Loaces dkk, 2011) maupun peningkat resistensi inang terhadap penyakit (Taghavi dkk, 2010).

Penggunaan bakteri endofit sebagai pupuk hayati sudah dikenal secara luas. Bakteri-bakteri dari spesies *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Xanthomonas* sp. dan *Serratia* sp. dilaporkan mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman (Vessey, dkk., 2003)(Bashan, dkk., 2004). Inokulasi bakteri tersebut sebagai pupuk hayati dilaporkan dapat meningkatkan hasil berbagai tanaman pokok seperti kacang tanah, gandum, padi dan jagung (Naveed, dkk., 2015).

2.2. Fermentasi

Istilah fermentasi berasal dari bahasa latin *fervere* yang artinya merebus. Asal kata ini berkaitan dengan munculnya gelembung udara pada proses fermentasi oleh ekstrak buah-buahan atau pati oleh ragi menjadi minuman beralkohol seperti *wine*. Secara umum, fermentasi dikenal sebagai proses perubahan gula menjadi alkohol, gas dan asam sebagai produk akhir dari metabolisme mikroorganisme seperti *yeast* atau bakteri yang terlibat. Adapun secara Biokimia dan Bioteknologi, fermentasi memiliki arti yang lebih luas yaitu proses katabolisme gula secara oksidatif yang melibatkan transfer elektron secara aerobik atau anaerobik guna menghasilkan energi (Stanbury, dkk., 1995).

Prinsip fermentasi banyak digunakan untuk keperluan komersial industri. Setidaknya ada lima kategori utama produk fermentasi yang banyak dikembangkan yaitu :

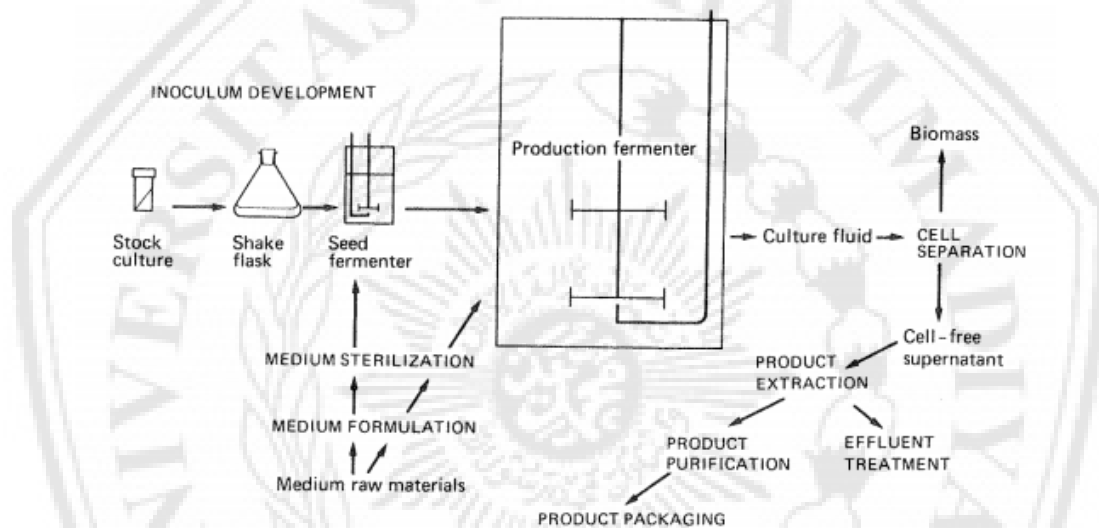
1. Fermentasi untuk menghasilkan biomassa mikroba.
2. Fermentasi untuk menghasilkan enzim mikroba.
3. Fermentasi untuk menghasilkan metabolit sekunder.
4. Fermentasi untuk menghasilkan produk rekombinan.
5. Fermentasi untuk memodifikasi senyawa (Stanbury, dkk., 1995).

Stanbury, dkk. (1995) selanjutnya menjelaskan bahwa terdapat enam komponen utama proses fermentasi yang perlu diperhatikan yaitu :

1. Formulasi media yang digunakan untuk pertumbuhan inokulum pada proses fermentasi.
2. Kesterilan media, fermenter dan peralatan perlengkapan lain.

3. Ketersediaan inokulum aktif dan murni untuk proses produksi.
4. Kondisi fermenter yang mendukung pertumbuhan optimum inokulum.
5. Ekstraksi produk akhir dan proses pemurniannya.
6. Pemisahan limbah sisa proses fermentasi.

Hubungan antara keenam komponen tersebut dijelaskan pada skema di bawah ini :



Gambar 1. Skema proses fermentasi (Stanbury, dkk., 1995)

2.3. Fermentor

Fungsi utama fermentor atau bioreaktor adalah menyediakan lingkungan ideal yang mendukung pertumbuhan inokulum guna menghasilkan produk yang diinginkan. Suatu fermentor yang baik disyaratkan memiliki kriteria minimal berikut ini, yakni mampu dioperasikan secara aseptik guna meminimalisasi kontaminasi, menyediakan aerasi dan agitasi yang cukup guna pertumbuhan inokulum dan memiliki kontrol sistem yang akurat (pH, suhu, aerasi, dll) (Stanbury, dkk., 1995).

2.4. Fase Pertumbuhan Bakteri pada Proses Fermentasi

Pertumbuhan inokulum pada proses fermentasi secara garis besar dapat dibagi ke dalam tiga fase yaitu :

1. Fase Awal (*lag phase*)

Fase ini dicirikan dengan sedikit atau tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media fermentasi. Saat diinokulasi, inokulum membutuhkan waktu untuk beradaptasi dengan lingkungan barunya sehingga pertumbuhan dan aktifitas inokulum pada awal fermentasi minim.

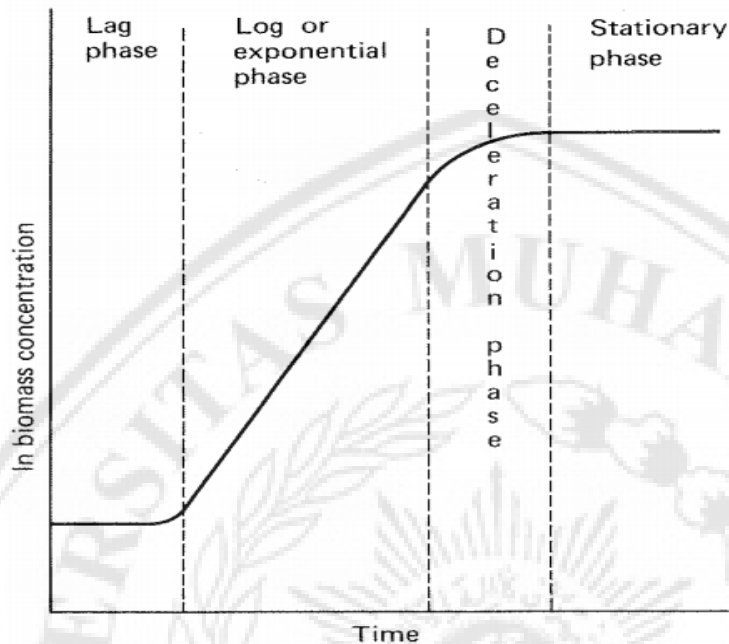
2. Fase Eksponensial (*exponential phase*)

Fase ini dicirikan dengan pertumbuhan inokulum yang perlahan meningkat secara eksponensial hingga dicapai kecepatan maksimum. Pada fase ini bakteri sudah beradaptasi dengan lingkungan baru dan mulai membelah diri secara biner. Pertumbuhan inokulum akan mengikuti pola eksponensial.

3. Fase Stasioner (*stationary phase*)

Pascafase perlambatan, laju pertumbuhan bakteri akan memasuki fase stasioner. Pada grafik, fase ini ditunjukkan oleh garis lurus yang menunjukkan bahwa laju pertumbuhan bakteri turun ke nol. Akan tetapi menurut Bull dalam Stanbury, dkk. (1995), mikroorganisme inokulum masih aktif bermetabolisme dan mensintesis metabolit sekunder yang tidak diproduksi saat fase eksponensial. Pada fase ini diperkirakan populasi bakteri sudah mencapai maksimum. Pertumbuhan dan aktifitas bakteri berada pada laju yang sangat minim sekali dikarenakan keterbatasan nutrisi yang tersedia dalam media.

Semua fase pertumbuhan inokulum pada proses fermentasi tersebut dapat diilustrasikan dalam grafik berikut :



Gambar 2. Grafik laju pertumbuhan inokulum pada proses fermentasi (Stanbury, dkk., 1995)

2.5. Beberapa Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi

2.5.1. Suhu

Suhu adalah salah satu komponen utama pada fermentasi. Suhu diketahui berpengaruh terhadap pertumbuhan dan populasi inokulum (Zhou, dkk., 2016) sehingga berdampak pada produksi metabolit yang dihasilkan (Vanningelgem, dkk., 2004). Saat suhu naik, molekul bergerak lebih cepat, kinerja enzim meningkat sehingga meningkatkan metabolisme secara keseluruhan. Namun jika suhu melewati titik optimum metabolisme akan turun dikarenakan enzim dan protein terdenaturasi (Blamire, 2000).

2.5.2. pH

pH media adalah faktor penting dalam proses fermentasi guna menghasilkan media yang sesuai dengan ekologi dan kemampuan adaptasi mikroorganisme. Rentang pH optimal untuk tiap mikroba berbeda-beda dan penyimpangan dari rentang tersebut dapat berakibat pada penurunan laju pertumbuhan mikroba (Arroyo-López, dkk., 2009). Secara garis besar, mikroorganisme dapat hidup pada rentang pH lebar antara 1.00-11.00. Namun pH sitoplasma cenderung netral dikarenakan mekanisme homeostatis yang dimiliki mikroorganisme untuk beradaptasi pada perubahan pH. Hal ini berkaitan dengan enzim yang dibutuhkan mikroorganisme yang optimum pada pH tertentu. Sehingga penyimpangan pH dapat menurunkan aktifitas enzim yang mempengaruhi metabolisme serta berakibat pada kerusakan sel (Hutkins dan Nannen, 1993).

2.5.3. Oksigen

Kebutuhan bakteri terhadap ketersediaan udara, dalam hal ini oksigen sangat beragam tergantung jenis bakteri tersebut. Menurut Hogg (2006) berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, bakteri dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok besar yaitu aerob (membutuhkan oksigen) dan anaerob (tidak membutuhkan oksigen). Walaupun begitu, kebutuhan terhadap oksigen pada tiap bakteri sangat beragam dan bakteri dibagi-bagi lagi ke dalam berbagai kelompok.

Obligat anaerob hidup pada kondisi tanpa oksigen sama sekali. Fakultatif anaerob dapat hidup pada kondisi tersedia oksigen (aerob) dan tanpa oksigen (anaerob). Aerotoleran adalah anaerob yang memiliki toleransi untuk bertahan pada

kondisi aerob tanpa memanfaatkan ketersediaan oksigen. Mikroaerofil hanya membutuhkan sedikit oksigen (Hogg, 2006).

Oksigen memegang peranan penting pada produksi bakteri menggunakan fermentor. Oksigen menjadi faktor pembatas yang menentukan kecepatan pertumbuhan bakteri dan produksi metabolit sekunder yang dihasilkannya (Stanbury, dkk., 1995)(Ndao, 2017). Beberapa jenis bakteri bersifat *fast metabolism* yang artinya dapat tumbuh sangat cepat sehingga menghabiskan oksigen di dalam media. Selain itu, senyawa metabolit yang dihasilkan seringkali merubah *rheology* media ketika satu komponen (misalnya metabolit sekunder) mempengaruhi viskositas media secara keseluruhan akibat produksinya yang terlampau cepat (Stanbury, dkk., 1995).

2.5.4. Media

Media merupakan salah satu aspek penting dalam proses fermentasi. Pada dasarnya, semua mikroorganisme membutuhkan air, sumber energi, karbon, nitrogen, mineral, udara (pada kondisi aerobik) dan vitamin (jika dibutuhkan). Media yang bagus setidaknya memiliki kriteria berikut yakni mampu menghasilkan produksi optimum dengan konsentrasi tinggi dan kualitas yang konsisten. Umumnya fermentasi aerobik memenuhi persamaan berikut :

Sumber karbon dan energi + Sumber nitrogen + O₂ + Zat lain -> Biomassa
+ Produk + CO₂ + H₂O + Kalor (Stanbury, dkk., 1995)

2.6. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah cabang ilmu yang mengkaji interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan materi. Landasan spektrofotometri adalah Hukum Beer-Lambert yang menyatakan bahwa ketika suatu berkas cahaya dilewatkan pada suatu larutan yang mengandung substansi tertentu, intensitas cahaya yang menembusnya dapat berkurang dikarenakan terjadi penyerapan (absorbansi) yang dilakukan senyawa tersebut. Spektrofotometri dilakukan pada rentang panjang gelombang $100 \text{ \AA} - 400 \text{ \mu m}$, namun umumnya dilakukan pada rentang *UV-Visible* (Behera dkk., 2012).

Spektrofotometri dapat digunakan untuk analisis kuantitatif senyawa organik dan molekuler (Behera dkk., 2012). Analisis spektrofotometri dapat digunakan untuk mengukur laju pertumbuhan mikroorganisme misalnya pada pertumbuhan bakteri. Susilo (2015) mencontohkan penggunaan spektrofotometri guna mengukur absorbansi media pertumbuhan bakteri endofit pupuk hayati pada $\lambda 420 \text{ nm}$.